

FDSS[®]/μCELL アプリケーションカタログ



iPS細胞由来心筋細胞の Ca²⁺トランジェントの測定と解析

化合物の薬効・安全性の評価



iPS細胞を応用した創薬と FDSS

近年、iPS細胞（人工多能性幹細胞）の開発が創薬の分野に大きなインパクトを与えました。実際に、ヒトiPS細胞由来の各種ヒト細胞が国内外数社から発売され、大量評価が可能な状況になってきており、今後は薬効評価や安全性試験など、創薬分野への応用が期待されます。実際に、化合物の有効性や安全性をiPS細胞由来心筋細胞を用いて評価する試みが始まっていますが、このような評価実験、特に前臨床試験よりも早期の段階における評価実験においては、簡便かつハイスループットおよび低コストな評価方法が求められています。

浜松ホトニクスでは、ヒト心筋細胞の収縮時の細胞質内のカルシウムイオン濃度変化（ Ca^{2+} トランジェント）をカルシウム感受性蛍光色素により測定してその波形を解析する方法により、化合物の有効性や安全性のハイスループット評価を可能とするFDSS/ μ CELLの新機能を開発しました。今後、FDSS/ μ CELLは、実績ある創薬スクリーニング用途に加えて、ヒトiPS細胞由来心筋細胞（hiPSC-CM）を使用した化合物の毒性評価用途でもご使用いただけたと考えられます。

FDSS/ μ CELLの紹介

FDSS/ μ CELLは、96/384ch対応の全ウエル同時分注・同時測定型マイクロプレートリーダーです。

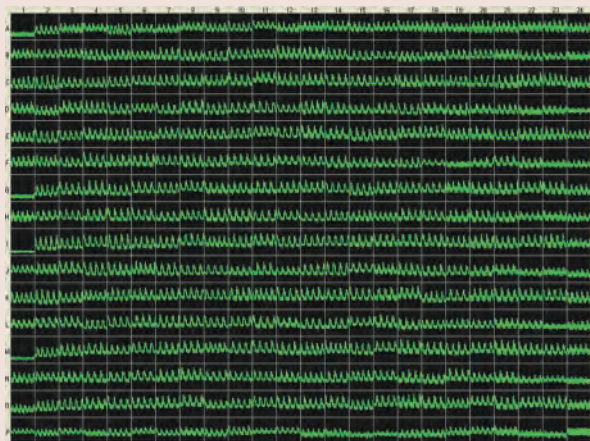
異なる種類や濃度の試薬を全ウエル同時に分注し、蛍光・発光の時間変化を全ウエル同時に測定できます。ウエル間に測定時間差が生じないため、生細胞を均一条件で測定することができます。創薬スクリーニング分野で培った技術をコンパクトに集約し、1台で創薬スクリーニング用途と研究用途の両方にご使用いただけます。

特長

- 小型で低価格、簡単操作
- 96/384全ウエルに同時分注、同時測定
- 全ウエルを均一に検出可能な専用光学系
- 長寿命・高安定なLED励起光源
- 2波長蛍光発光の同時測定も可能（オプション）

iPS細胞由来心筋細胞内 Ca^{2+} 測定

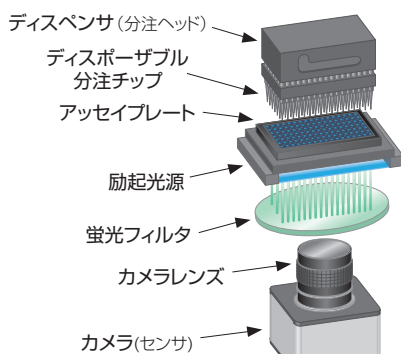
Cell:iCell® Cardiomyocytes (Cellular Dynamics International)
Probe: Fluo-8 AM



96/384ウエルフォーマットでiPS細胞由来心筋細胞のカルシウムイオン濃度変化を測定することが可能です。

上図は384ウエルフォーマット

【FDSS/ μ CELLの概略図】



新機能

- 心筋細胞の拍動を安定的に保つ温度制御
- 高速データ取得によるより正確な波形解析

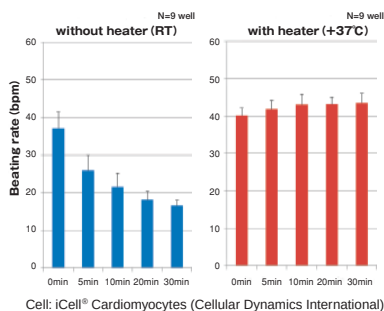
FDSS/ μ CELLを使用して、信頼性の高い評価系を構築するための新機能を開発しました。下記3つのオプションを搭載したFDSS/ μ CELLを用いることで、iPSC-CMを用いた化合物の心毒性評価を安定かつ効率的に実施することが可能です。



新オプション①

ヒーターユニット

FDSS/ μ CELLのアッセイプレートホルダ近傍を+35℃~+37℃に保温する専用のヒーターユニットです。iPSC-CMは周囲の温度変化の影響を受けて拍動数が顕著に変化するため、拍動数を生理的環境下にて一定にすることが実験を行う上で重要です。ヒーターと内部温度センサを追加することで、より体内に近い条件下でiPSC-CMを安定的に測定することが可能です。



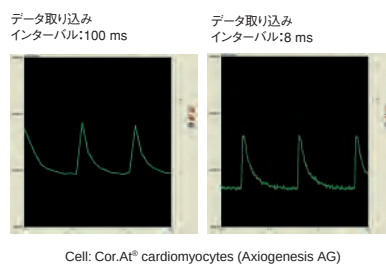
iPS細胞由来心筋細胞の拍動数に対するヒーターユニットの効果

マイクロプレート内の細胞を、CO₂インキュベーター内での染色後直ちにFDSS/ μ CELLで測定し、Ca²⁺変動のピーク回数から拍動数を求めました。ヒーターユニットが無い場合、拍動数が時間経過とともに低下したのに対し、ヒーターユニットを使用した場合には、30分経過後においても拍動数が維持できました。

新オプション②

高速データ取り込み用オプション

FDSS/ μ CELLで非常に短いインターバルで測定データを取り込む専用ソフトウェアと高速高感度センサのパッケージです。iPSC-CM内Ca²⁺トランジェントを詳細に解析するためには、高頻度な測定データの取り込みが重要です。本オプションにより、ミリ秒単位の速さで生じるiPSC-CM内Ca²⁺濃度変化を従来より正確に評価することが可能です。



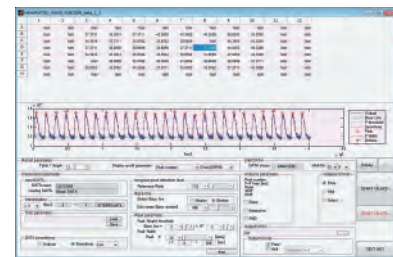
iPS細胞由来心筋細胞内カルシウムイオン変動の高速データ取り込み

データ取り込みインターバル8 msでの高速データ取り込みでは、100 msでの取り込み時と比較してCa²⁺濃度上昇の立ち上がりやボトム値に対するピーク値、単位時間あたりのピーク数などを、より正確に取得することが可能です。取得データは、Ca²⁺濃度変化の詳細解析に有用です。

新オプション③

波形解析用ソフトウェア

FDSS/ μ CELLで取得した複数ピークの解析に有効な専用ソフトウェアです。細胞内Ca²⁺トランジェントに伴う蛍光輝度変化の波形解析には手間のかかる作業が多く、簡便な処理が必要とされていました。本ソフトウェアにより、波形解析を自動化することで、複数の波形を迅速に処理することが可能となります。



画面は開発中のものです

波形解析用ソフトウェア表示画面例

本ソフトウェアは、FDSSソフトウェアから起動します。FDSS/ μ CELLで取得した96/384ウェルフォーマットの測定データについて、手動・自動で解析条件を設定した後、16項目の解析が可能です。

波形解析用ソフトウェア

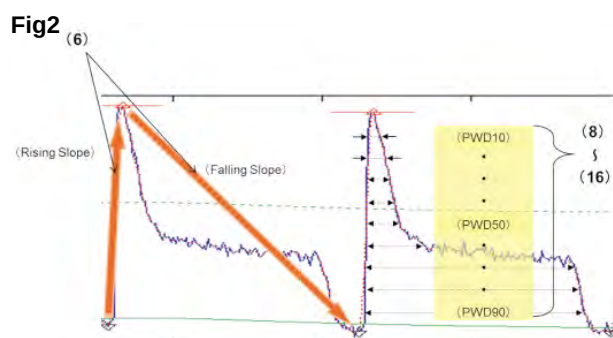
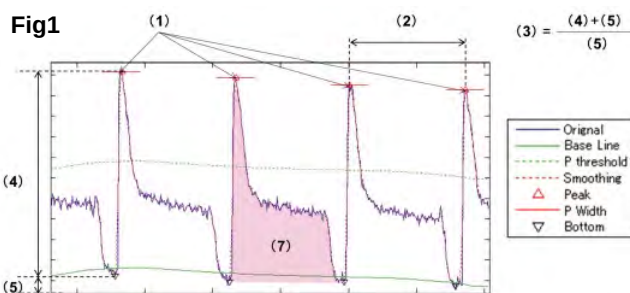
iPSC-CM内Ca²⁺トランジェントの複数ピークを迅速・簡便に解析でき、手間のかかる波形の読み取りや解析作業を強力にサポートします。

特長

- 細胞内Ca²⁺変動を迅速に可視化、解析
- 解析条件の自動取得や視覚的なセットアップが可能で使いやすい
- 柔軟なデータ処理、条件設定により、様々な波形解析に対応
- 16項目の解析が可能で、iPSC-CMの評価を総合的にサポート

解析項目

(1)	Peak number (Total, BPM) 検出ピークの数
(2)	P-P time [ms] (Ave, Std, Max, Min) 検出ピーク間の時間
(3)	Ratio (Ave, Std) 検出ピークのレシオ値 ※Ratio = (AMP + RMP) / RMP
(4)	AMP (Ave, Std) 検出ピークの値からRMPを引いた値
(5)	RMP (Ave, Std) 検出ボトム値
(6)	Slope (Ave, Std) 検出ピークに対する反応の傾き 解析位置を選択可能。 0 % ~ 100 %、10 % ~ 90 %、20 % ~ 80 %、30 % ~ 70 %
(7)	Integration (Ave, Std) 検出ピークを挟むボトム間のデータの積算値
(8)	PWD (PWD10 ~ 90) [ms] (Ave, Std) 検出ピークに対する、指定した反応量のCa ²⁺ 変動持続時間
(16)	10 %、20 %、30 %、... 80 %、90 %、の解析を選択可能



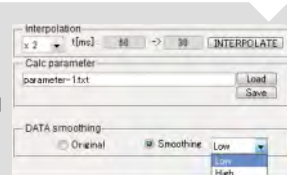
操作手順

1 FDSS測定データの読み込み

FDSSソフトウェア上のボタンで、波形解析用、ソフトウェア起動、データ読み込み

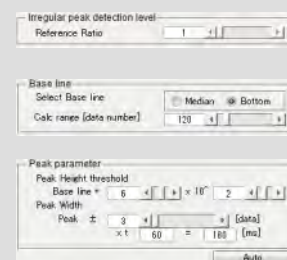
2 解析に共するデータの処理

- Interpolation
データ間を補間して、データ数を増加
- Smoothing
測定データのノイズを除去するか選択可能



3 解析条件設定

- Irregular peak detection level
イレギュラーピークの判断基準
- Base line
波形のベースラインを検出するためのパラメータ設定
- Peak Parameter
ピークとして検出することができるピークの最低反応量、またピーク間の最低値
- AUTO
解析パラメータを自動計算



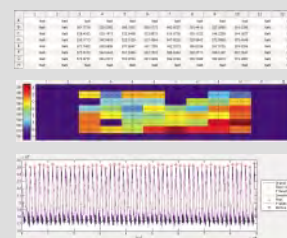
4 解析実行

解析する項目を選択して、全ウエル一括解析 / 各ウエル解析



5 解析結果の表示

- 全ウエル一括表示 / 各ウエル表示
- プレートマップに各解析結果の値を表示
- 解析結果の値の大小に対応したヒートマップを表示
- ウエルごとのピーク検出グラフを表示



6 解析結果の出力

プレートフォーマット / 各ウエルごとに出力、テキストファイルに対応 (.txt)



実験の手順

iPS細胞由来心筋細胞の Ca^{2+} アッセイ

(用いる細胞: ReproCardio 2 (株式会社リプロセル))

1

Thawing and Plating cells in 96 well microplate

Step1

使用するマイクロプレートを指定方法でCoating

Step2

細胞供給会社のUser's Guide※に準じた細胞播種と培養を実施

※User's Guideについて

以下URLよりReproCardio 2 の取扱説明書を取得可能です。

<https://www.reprocell.com/wp-content/uploads/2013/09/RCESD008ReproCardio2.pdf>

なお、User's Guideは随時更新されております。最新版は別途ご確認ください。

2

Loading of Ca^{2+} ion indicator into cells

Loading Bufferの構成品リスト

HEPES-Hank's Balanced Salt Solution (pH7.4)	Life Technologies	#14025-092
2 μM Fluo 8-AM	Life Technologies	#15630-056
0.05 % Pluronic F-127	AAT Bioquest	#21083
1.25 mM Probenecid	Life Technologies	#P-6866
	Sigma	#P8761

Step1

Loading Bufferの調製 (+37 °C)

Loading

- Culture mediumを除く
- +37 °C Loading Bufferを80 μL /well分注する
- 1時間、インキュベーター (+37 °C 5 %CO₂) 内で色素のLoading

Step2

Wash out

- Loading Bufferを除く
- +37 °C HEPES-HBSSを100 μL /well分注する

Step3

3

FDSS Data Acquisition / Data Analysis

Step1

装置セットアップ

- 測定の30分前に電源ON、カメラ冷却とステージ保温を実施する
- FDSSソフトウェアを起動する

Step2

プロトコル設定 (プロトコル画面からの設定)

- インターバルは10 ms~30 msの範囲、及びサンプリング数を設定する
- 分注条件を設定する (分注量・分注速度・分注高さ・吸引)

Step3

データ取得と解析

- 設定プロトコルにてデータ取得を実施し、ファイル保存する
- 任意のパラメータにより波形解析を実施する

測定・解析例

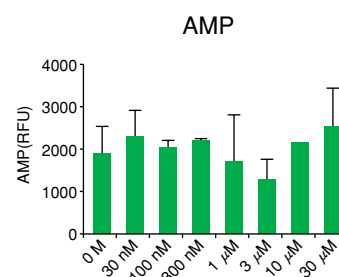
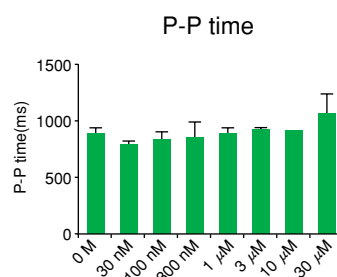
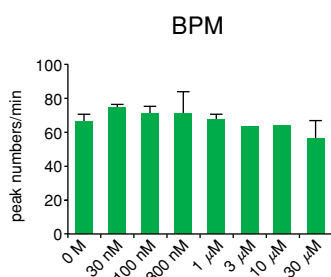
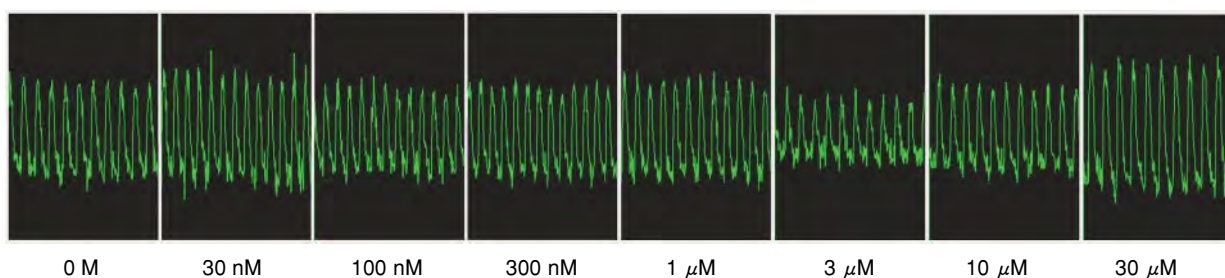
iPS細胞由来心筋細胞を用いた化合物の毒性評価例

薬効や心毒性が公知の化合物（医薬品）の iPSC-CM への影響を評価する目的で、適切な温度環境設定、非常に高速なデータ取り込みが可能となった FDSS/ μ CELL を用いて、ヒト iPS 細胞由来心筋細胞（ReproCardio 2）のカルシウムイオンアッセイを実施しました。

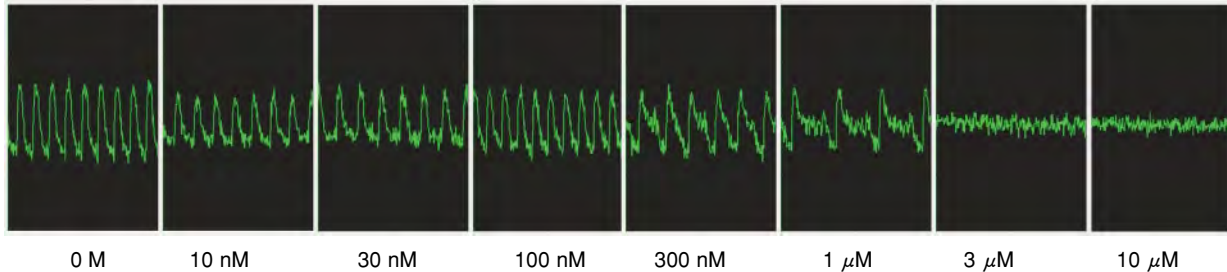
評価化合物リスト

薬剤	説明	不整脈	収縮性	分注後の薬剤濃度
Aspirin	シクロオキシゲナーゼ (COX) 阻害剤 右記濃度で、心筋細胞への毒性は見られない			30 nM ~ 30 μ M
E-4031	hERGカリウムチャネルブロッカー 心筋細胞の再分極時にIKrを選択的に抑制する化合物	●		10 nM ~ 10 μ M
Isoproterenol	β 受容体に作用して心筋細胞を刺激する化合物		●	30 nM ~ 30 μ M

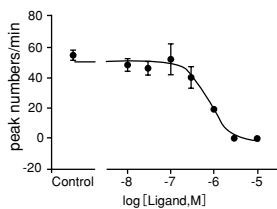
化合物① Aspirin



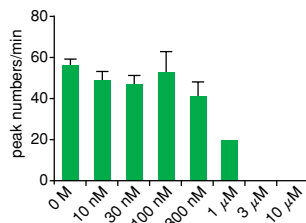
化合物② E-4031



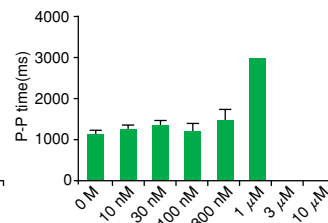
IC50 from BPM



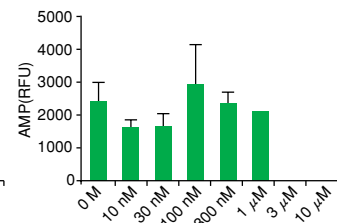
BPM



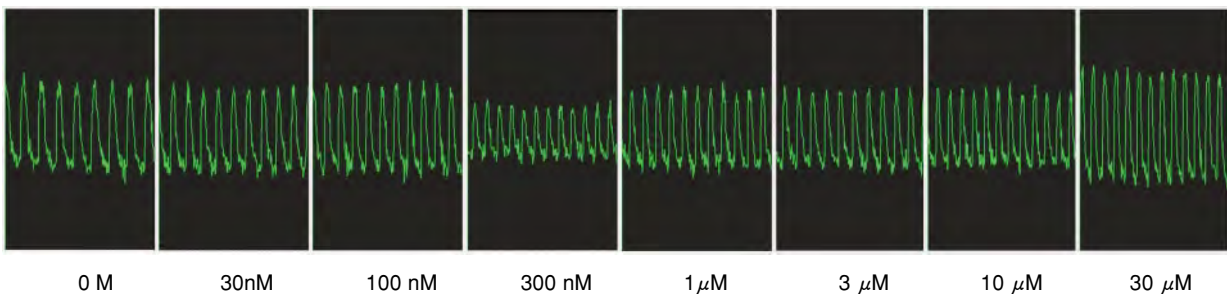
P-P time



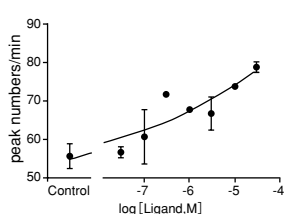
AMP



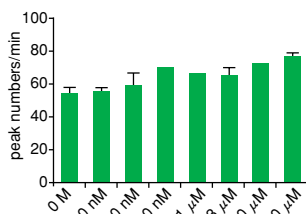
化合物③ Isoproterenol



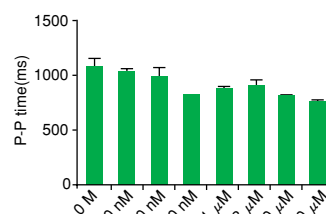
EC50 from BPM



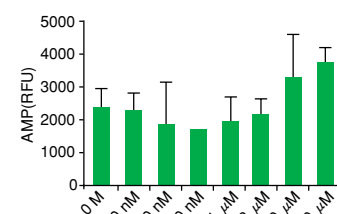
BPM



P-P time



AMP



FDSS/ μ CELLで取得した Ca^{2+} 濃度変化の波形を解析した結果から、各評価化合物について、薬効の用量依存性や心筋拍動への影響を確認することができました。

本例のようにFDSS/ μ CELLは、創薬プロセスの従来より早期の段階における心毒性化合物の評価・同定用ツールとして使用することができます。FDSS/ μ CELLを用いたiPSC-CMの Ca^{2+} アッセイにより、潜在的な心毒性化合物の影響を容易に検出・評価することができます。

本アプリケーションに必要なシステム構成

(構成要素・型名・説明)

分注装置本体 A11529-01、A11529-03、A11529-04、M11031-01	96ウェル、384ウェルのクリアボトムプレート（黒）に対応、分注高さ可変 アッセイプレート：1枚、試薬プレート：2枚 を設置可能（設置は手置き）
分注ヘッド（選択可） A10118-24（96ch）、A10118-26（384ch）	96ウェル、384ウェルマイクロプレートへの試薬同時分注が可能、チップ式 96ウェル同時分注（10 μ L～200 μ L）、384ウェル同時分注（1 μ L～30 μ L）
チップ着脱器 A11529-02	96 ch、384 chの専用分注チップの着脱に使用
FDSS/ μ CELL用光源（Fluo-4） L11601-01	B励起用LED光源ユニット ex：470 nm、em：540 nm
蛍光/発光対応センサ C9743-13	超高感度EM-CCDカメラ
ヒーターユニット A11529-14	温風方式、アッセイプレート近傍温度を +35 $^{\circ}$ C～+37 $^{\circ}$ C に制御
専用データ解析装置 C7903-05	FDSS制御用PC、FDSSソフトウェア含む
高速データ取り込み用オプション U8524-11	高速データ取り込み用 FDSSソフトウェアオプション
波形解析用ソフトウェア U8524-12	心筋細胞内Ca ²⁺ 測定波形解析用 FDSSソフトウェアオプション

消耗品

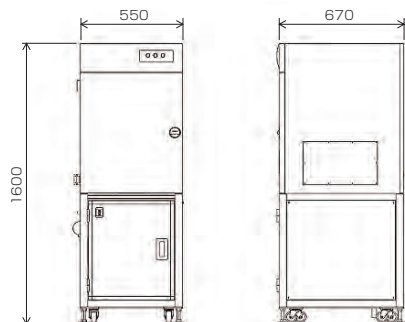
FDSS7000用/ μ CELL用96黒チップ10ラック入り A8687-32	96ウェルマイクロプレート用使い捨てプラスチック製チップ、10ラック入り
FDSS7000用/ μ CELL用384黒チップ10ラック入り A8687-62	384ウェルマイクロプレート用使い捨てプラスチック製チップ、10ラック入り

外形寸法

外形寸法/質量（本体）	550 mm(W) × 1600 mm(H) × 670 mm(D)/約200 kg
外形寸法/質量（データ解析装置）	300 mm(W) × 500 mm(H) × 500 mm(D)/約20 kg

【外形寸法図（単位：mm）】

●本体



製品へのお問い合わせ、説明資料や訪問説明のご要望、また実機を用いたデモンストレーションをご希望の方は是非 弊社までご連絡ください。



なお、株式会社リプロセル様のオープンラボにて、FDSS/ μ CELLをご紹介します。リプロセル社のヒトiPS細胞由来心筋細胞を用いたデモンストレーションが可能です。

詳細は、弊社へ または 以下URLよりお問い合わせください。
<https://www.reprocell.com/contact/>

★FDSS は浜松ホトニクス（株）の登録商標です。

※本カタログの掲載内容は、2014年1月現在のものです。本内容は改良のため予告なく変更する場合があります。

浜松ホトニクス株式会社

www.hamamatsu.com

□ システム営業推進部 〒431-3196 浜松市東区常光町812
 TEL (053)431-0150 FAX (053)433-8031
 E-Mail sales@sys.hpk.co.jp

□ 仙台営業所 TEL (022)267-0121 FAX (022)267-0135
 □ 筑波営業所 TEL (029)848-5080 FAX (029)855-1135
 □ 東京営業所 TEL (03)3436-0491 FAX (03)3433-6997
 □ 中部営業所 TEL (053)459-1112 FAX (053)459-1114
 □ 大阪営業所 TEL (06)6271-0441 FAX (06)6271-0450
 □ 西日本営業所 TEL (092)482-0390 FAX (092)482-0550

SBI50100J01
 JAN/2014 IP